

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-509181

(43) 公表日 平成10年(1998) 9月8日

(51) IntCl. ⁸	識別記号	F I	
C 0 7 D 295/22		C 0 7 D 295/22	A
A 6 1 K 31/40		A 6 1 K 31/40	
31/445		31/445	
31/495		31/495	
31/535		31/535	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平8-517097	(71) 出願人	アメリカ合衆国 アメリカ合衆国、メリーランド州 20892 -9902、ベセスダ、ナショナル インステ イテューツ オヴ ヘルス、オフィス オ ヴ テクノロジー トランスファー、ボッ クス オーディーティー (総地なし)
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)11月20日	(72) 発明者	コーサイス、ロナルド ジェイ、 アメリカ合衆国、ルイジアナ州 71118、 シュリーヴポート、グースベリー ヒル、 1153
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997)5月22日	(74) 代理人	弁理士 高島 一
(86) 国際出願番号	PCT/US95/15381		
(87) 国際公開番号	WO96/15781		
(87) 国際公開日	平成8年(1996)5月30日		
(31) 優先権主張番号	08/344, 341		
(32) 優先日	1994年11月22日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 転移リスクを減少させるための酸化窒素放出薬剤の使用

(57) 【要約】

酸化窒素放出N₂O₂⁻官能基を含有する酸化窒素放出化合物を哺乳類に投与することを含む、哺乳類における癌性細胞と非癌性構造との間の接着(adherence)を阻害する方法。当該化合物は当該哺乳類に接着(adherence)阻害有効量の酸化窒素を放出することができるものである。

(2)

特表平10-509181

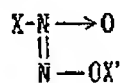
【特許請求の範囲】

1. 酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基を含有する酸化窒素放出化合物を哺乳類に投与することを含む、哺乳類における癌性細胞と非癌性細胞との間の接着 (adherence) を阻害する方法であって、当該化合物は当該哺乳類に接着 (adherence) 阻害有効量の酸化窒素を放出することができるものである方法。

2. 当該化合物が、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチドおよび核酸からなる群より選ばれる高分子である請求の範囲第1項記載の方法。

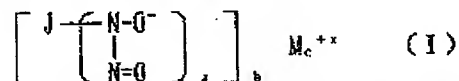
3. 当該高分子が、組織特異的、細胞特異的または腫瘍特異的抗体またはその断片、腫瘍細胞接着 (tumor cell attachment) に適した受容体-リガンド相互作用の認識配列を含有する蛋白質、抗化学走性剤およびホルモンからなる群より選ばれる請求の範囲第2項記載の方法。

4. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 基が、式



(式中、Xは有機または無機部位であり、X'はX、医薬上許容される金属中心または医薬上許容されるカチオンからなる群より選ばれる。) に含まれる基であり、当該 $N_2O_2^-$ 基はXまたはX'の少なくとも1つを介して当該生体高分子に結合している請求の範囲第1項記載の方法。

5. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



〔式中、Jは有機または無機部位であり、 M_c^{+x} は医薬上許容されるカチオン (式中、xはカチオンの原子価である) であり、aは少なくとも1であり、bおよび

cは中性化合物を与える最も小さい整数である。〕に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

6. Jが炭素原子以外の原子を介して、複合体の残りの部分の窒素に結合している部位である請求の範囲第5項記載の方法。

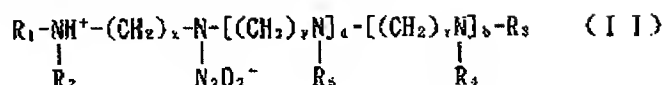
7. 酸化窒素放出基がアラノシンまたはドバステンの塩以外の化合物である請

(3)

特表平10-509181

求の範囲第5項記載の方法。

8. 当該酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基が式：

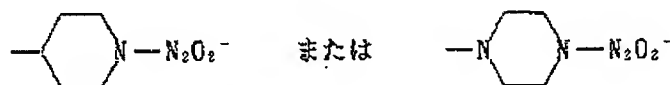


(式中、bおよびdは同一または異なって0または1であり、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は同一または異なって水素、 C_{1-8} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、yおよびzは同一または異なって2～12の整数である。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

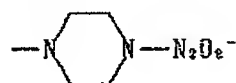
9. 当該酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基が式：



(式中、Bは



であり、 R_6 および R_7 は同一または異なって水素、 C_{1-8} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、fは0～12の整数であり、ただしBが置換されたピペラジン部位

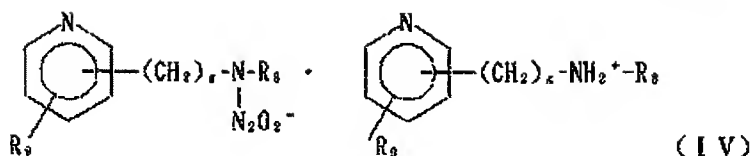


の場合、fは2～12の整数である。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

10. 当該酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基が式：

(4)

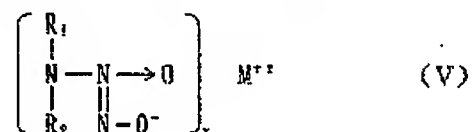
特表平10-509181



(式中、 R_8 は水素、 C_{1-6} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フクロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、 p -トルイル、 t -ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ- t -ブトキシカルボニルであり、 R_9 は水素または C_1-C_{12} 直鎖または分枝鎖アルキルであ

り、 g は2～6の整数である。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

11. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：

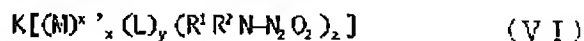


(式中、 R_1 および R_2 は独立して直鎖または分枝鎖 C_1-C_{12} アルキル基およびベンジル基からなる群より選ばれる。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

12. R_1 および R_2 が介在する窒素原子と共に結合して複素環基を形成するように R_1 および R_2 が選ばれ、 M^{+x} は医薬上許容されるカチオンであり、 x はカチオンの原子価である請求の範囲第11項記載の方法。

13. 複素環基がピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノおよびモルホリノからなる群より選ばれる請求の範囲第12項記載の方法。

14. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



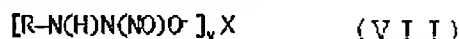
(式中、 M は医薬上許容される金属、または x が少なくとも2の場合、異なる2種の医薬上許容される金属の混合物であり、 L は $(R^1 R^2 N-N_2O_2)$ とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 R^1 および R^2 はそれぞ

(5)

特表平10-509181

れ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、 x は1～10の整数であり、 x' は金属Mの形式的な酸化状態を示し、1～6の整数であり、 y は1～18の整数であり、ただし、 y が少なくとも2の場合、配位子Lは同一または異なっていてよく、 z は1～20の整数であり、 K は化合物を必要な程度まで中性にする医薬上許容される対イオンである。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

15. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、 R は C_{2-8} 低級アルキル、フェニル、ベンジルまたは C_{3-8} シクロアルキルであり、任意の R 基は1～3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基は同一または異なっていて、ハロゲン、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-CH(O)$ 、 $-C(O)OH$ および $-NO_2$ からなる群より選ばれ、 X は医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、または C_{1-8} 低級アルキル、 $-C(O)CH_3$ および $-C(O)NH_2$ からなる群より選ばれる医薬上許容される有機基であり、 y は1～3であり、 X の原子価と一致する。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

16. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



【式中、 R_1 および R_2 は独立して、 C_{1-12} 直鎖アルキル、アルコキシまたはアシルオキシで置換された C_{1-12} 直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換された C_{2-12} 直鎖アルキル、 C_{3-12} 分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換された C_{3-12} 分枝鎖アルキル、 C_{3-12} 直鎖オレフィンおよび C_{3-12} 分枝鎖オレフィン（これらは置換されていないか、またはヒドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されている）から選ばれるか、あるいは R_1 および R_2 がそれらが結合している窒素原子と共に複素環基を形成し、 R_3 は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、アシルオキシまたはアルコキシで置換されている C_{1-12} 直鎖および C_{3-12} 分

(6)

特表平10-509181

枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシル

オキシまたはヒドロキシで置換されているC₂₋₁₂直鎖またはC₃₋₁₂分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されているC₁₋₁₂アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基、あるいはR₃は式-(CH₂)_n-ON=N(O)NR₁R₂(式中、nは2~8の整数であり、R₁およびR₂は上記に定義した通り)で表される基である。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の方法。

17. R₁、R₂およびR₃はヘテロ原子のαにハロゲンまたはヒドロキシ置換基を含む請求の範囲第16項記載の方法。

18. 複素環基がピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノおよびモルホリノからなる群より選ばれる請求の範囲第16項記載の方法。

19. 当該哺乳類の当該癌性細胞が潜在的に転移性である請求の範囲第1項記載の方法。

(7)

特表平10-509181

【発明の詳細な説明】

転移リスクを減少させるための酸化窒素放出薬剤の使用

発明の技術分野

本発明は、哺乳類における癌性細胞と非癌性細胞との間の接着(adherence)を阻害する方法、より詳細には、酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基を含有する酸化窒素放出薬剤(nitric oxide-releasing agent)を用いて哺乳類における転移リスクを減少させる方法に関する。

発明の背景

現在の癌治療法には外科手術、放射線療法、化学療法および免疫療法が含まれる。通常、これらの方法の一またはそれ以上が組み合わせて用いられ、外科手術と放射線療法が最も癌を根絶するのに有効である。しかし、外科手術と放射線療法はどちらも局所的治療法であり、これらの治療は腫瘍が局在化しているときのみに有用である。もし癌が全身的または転移性ならば、化学療法と免疫療法がより有用な治療方法である。

転移は腫瘍治療の最も深刻な問題の一つであり、致命的状態のほとんどを引き起こす。転移のリスクは原発性腫瘍の治療において特に高く、よってこの段階で転移の形成を緊急に予防する必要がある。

転移では、原発性腫瘍から循環系またはリンパ系への癌性細胞の放出、続く毛細管および後毛細管小静脈の壁への癌性細胞の接着(adhesion)および管外遊出が生じ、その結果として、癌性細胞が新たな組織部位に移動し、一またはそれ以上の続発性腫瘍の形成を起こす。一旦、腫瘍細胞が循環系へのアクセスを得ると、その後に続く転移カスケードの段階では、微小血管内皮への接着(adhesion)および基底膜(血管壁を取り囲む薄い細胞外マトリックスであり、特定の蛋白質分解酵素により分解されると考えられている)の浸潤が生じる。転移性癌性細胞の内皮への接着(adhesion)には、VCAM、VLA-4、E-セレクトイン(E-selectin)およびシアリルルイスX(sialyl-Lewis X)のような接着構造(adhesive structure)が介在する。同様に、腫瘍細胞の基底膜への接着(adhesion)には、ラミニン、フィブロネクチンおよびコンドロネクチン(chondronectin)のような種

(8)

特表平10-509181

々の糖蛋白質に結合する特異的細胞表面受容体が介在する。

ラミニンは基底膜特異的糖蛋白質であり、3つの鎖、すなわち α 、 β 1、および β 2から構成され、その形状は十字形で、多くの癌（例えば、結腸癌および乳癌）に好まれる糖蛋白質である（Liotta, Cancer Res., 46, 1-7(1986); Terranova et al., PNAS USA, 80, 444-448(1983); Terranova et al., Cancer Res., 42, 2265-2269(1982); およびVlodavsky et al., Nature, 289, 304-306(1981)）。ラミニンは細胞接着(cell adhesion)、移動、増殖、神経突起伸長および分化の促進を活性化する（例えば、Timpl et al., J. Biol. Chem., 254, 993(1979), Engel et al., J. Mol. Biol., 150, 97(1981), Kleinman et al., J. Cell. Biochem., 27, 317(1985)およびGraf et al., Cell, 48, 989(1987)参照）。細胞表面にラミニン受容体を有する悪性細胞は通常の細胞に比べてより容易にラミニンに結合し接着(attach)する。

運動性因子および組織化学走性因子は悪性腫瘍細胞の運動を刺激することができ、ある種の腫瘍細胞の臓器特異的転移に関連している（Hujanen et al., Cancer Research, 45, 3517-3521(1985)）。化学誘引物質は腫瘍細胞転移に重要な役割を果たしているかもしれない。

転移は、原発性腫瘍から離れた臓器部位への腫瘍細胞の広がりを生じるので、種々の形態の化学療法および免疫療法が転移の治療に用いられてきた。従来の化学療法は、5-フルオロウラシル（5FU）、マイトマイシン（MMC）、シスプラチン（CDDP）またはアドリアマイシン（ADR）のような核酸または蛋白質の合成の阻害剤を用いて主に行われてきた。しかしながら、これらの阻害剤は非常に強い副作用を伴うので、それらの使用は実質的に補助的治療に限定されてきた。

最近、インターフェロンやインターロイキンのようなサイトカインの投与によ

って免疫学的防御システムである異物排除機構(foreign body exclusion mechanism)を増強することにより癌を治療する試みが行われている。もちろん、これらの物質は生物に異物が侵入したときにのみ局所的に生成される。従って、そのような化合物を全体的または全身的に投与すると、副作用も引き起こす。さらに、

(9)

特表平10-509181

生物に癌細胞を異物として認識するのが困難だとすると、この治療法を適用できる癌は非常に限定される。

同様に、生物学的応答調節剤 (Biological response modifier, BRM) のような免疫強化抗腫瘍剤の使用もまた副作用を伴う。

米国特許第5,306,714号 (Okamoto et al., 1994年4月26日) および米国特許第5,004,735号 (Okamoto et al., 1991年4月2日) には、(S)-2,3-ジヒドロポリブレノールおよび(S)-2,3-ジヒドロポリブレノールモノホスフェートおよびそれらの医薬的に許容される塩を転移の治療に使用することが開示されている。

N-(3-フェニルプロピル)-1-デオキシノジリマイシン、1-デオキシノジリマイシン、D-グルカローδ-ラクタム、および6-O-トリフェニルメチル-D-グルコ-δ-ラクタムのようなラクタム類が、米国特許第4,985,445号 (Suzuki, 1991年1月15日) に転移の阻害剤として記載されている。

米国特許第5,242,692号 (Djaldetti et al., 1993年9月7日) には、筋肉組織および筋肉細胞培養物から単離され得る、分子量約25,000~30,000ダルトンの腫瘍細胞増殖阻害剤が開示されている。

米国特許第5,231,082号 (Schasteen, 1993年7月27日) には、抗転移環状ペプチドが開示されている。この環状ペプチドは67kDaのラミニン受容体に結合し、ラミニンが介在する細胞接着 (cell adhesion) およびメラノーマ細胞による転移増殖を阻止すると言われている。他の抗転移ペプチド (ペンタペプチド $\text{tyr-ile-gly-ser-arg}$ を含む) が、ヨーロッパ特許出願公開第0278781号, Iwamoto et al., *Science*, 238, 1132(1987), および Graf et al., *Biochemistry*, 26, 6896 (1987) に開示されている。ラミニンβ1ペプチドおよ

びその腫瘍細胞転移の治療における使用が米国特許第5,175,251号 (Johnson et al., 1992年12月29日) に記載されている。転移を阻害するためにペンタペプチドのようなアシル化ペプチドを投与することが米国特許第5,039,662号 (Schasteen et al., 1991年8月13日) に記載されている。アシルアミノアルキルピリジンアミドの投与が転移の治療方法として米国特許第5,030

(10)

特表平10-509181

、642号 (Fuller et al., 1991年7月9日) に記載されている。このアミドは5-リボキシゲナーゼの特異的阻害剤として記載され、細胞浸潤活性と転移を阻害すると言われている。

5-(2-クロロベンジル)-4, 5, 6, 7-テトラヒドロチエノ [3, 2-c] ピリジンの転移治療のための使用が米国特許第4, 963, 559号 (Suzuki, 1990年10月16日) に記載されている。

ある種のカスタノスベルミンエステル類 (castanospermine esters) およびカスタノスベルミン (castanospermine) の投与による転移の阻害が、米国特許第4, 952, 585号 (Sunkara et al., 1990年8月28日) および米国特許第4, 792, 558号にそれぞれ記載されている。

臓器細胞レクチンに特異的な単糖類および/またはそのような単糖類を含有する複合糖質、特に β -D-ガラクトースおよび/または末端 β -D-ガラクトース部分を含有する複合糖質の転移治療のための使用が米国特許第4, 946, 830号 (Pulverer et al., 1990年8月7日) に記載されている。

Terranova et al. ((1982)前記) には、ある種の転移性細胞をラミニンに対する抗体で処置することが開示されている。この抗体は転移性細胞の基底膜との相互作用能力を低下させ、細胞がマウスに注射されたときに生じる転移の数を減少させる。

転移 (肺、胸部および結腸の原発性腫瘍から生じるようなもの) をコントロールするためにリボヌクレアーゼ阻害剤を投与することが米国特許第5, 175, 005号 (Fukushima et al., 1992年12月29日) に記載されている。

プロテインキナーゼCを阻害する化合物を転移を阻害する手段として使用することが米国特許第5, 151, 360号 (Handa et al., 1992年9月29日) に開示されている。

転移を阻害するためのN, N, N-トリメチルスフィンゴシンの使用が米国特許第5, 137, 919号 (Igarashi et al., 1992年8月11日) に記載されている。

クロスグリ (black currant) の種から得た脂質を栄養または医薬組成物の形態

(11)

特表平10-509181

(これはエイコサペンタノイックアシッド(eicosapentanoic acid)およびジホモ- γ -リノレン酸の生物学的利用率を促進するが、一方でアラキノイックアシッド(arachinoic acid)の生物学的利用率を抑制する)で投与することで細胞接着(cell adhesion)および、それにより転移を防止することが米国特許第5, 141, 958号(Crozier-Willi et al., 1992年8月25日)に記載されている。

手術後の悪性腫瘍転移を抑制するためのレクチン、アブリン(Abrin)およびアブラス(Abrus)アグルチニンの投与が米国特許第5, 053, 386号(Tung, 1991年10月1日)に開示されている。メラノーマおよび乳癌のような転移の高い可能性を特徴とする腫瘍の手術切除後の5-アミノ-または置換アミノ-1, 2, 3-トリアゾールの投与が米国特許第5, 045, 543号(Hupe, 1991年9月3日)に記載されている。

従って、一般的に癌の治療に、そしてより詳細には転移の治療に、多くの腫瘍阻害物質が実際に使用され、より多くの物質が潜在的な使用可能性を有することが明らかである。しかしながら、今日においても癌の一般的療法はなく、それゆえに化学療法に貢献するどんなものでも、少なくとも癌および関連する転移の治療により有効な薬剤を得ることを望んでいる医療従事者には喜んで受け入れられる。

NOを合成する腫瘍細胞は合成しないものより転移性が少ないと考えられる(Radomski et al., *Cancer Research*, 51, 6073-6078(1991); Dong et al., *Cancer Research*, 54, 789-7793(1994))。外因性のNOの投与が転移に効果を及ぼすか否かはわかっていない。しかし、市販のNO-放出性化合物を用いてこ

の仮説を試験するのに伴う問題は、これらの化合物が部位特異的にNOを放出することができないことである。体全体にNOを放出する現在市場に出ているNOプロドラッグを用いて癌患者を治療するのは望ましくないだろう。なぜなら、それは他のNO-感受性組織に、腫瘍細胞に対するどんな有益な効果も上回りうる望ましくない副作用をもたらすであろうからである。

酸化窒素は純粋な形態では、水性媒体に対して限られた溶解度を有する反応性の高いガスである(窒素酸化物の環境保健規準に関するWHO対策グループ、窒

(12)

特表平10-509181

素酸化物、環境保健規準4 (Oxides of Nitrogen, Environmental Health Criteria 4) (世界保健機関：ジュネーブ、1977年)。従って、大多数の生物学的システムに酸化窒素を早期に分解させることなく確実に導入することは困難である。

代謝されて酸化窒素を放出する化合物および水溶液中で自発的に酸化窒素を放出する化合物を含めた、酸化窒素を送達することのできる多くの化合物が薬理学的目的で開発されている。

代謝されて酸化窒素を放出する化合物には、広く使用されているニトロ血管拡張剤、ニトログリセリンおよびニトロプルシドナトリウムが含まれ (Ignarro et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 218, 739-749(1981); Ignarro, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 535-560(1990); Kruszyna et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 91, 429-438(1987); Wilcox et al., Chem. Res. Toxicol., 3, 71-76(1990))、これらの化合物は比較的安定であるが、活性化により酸化窒素を放出する。この特徴はある適用では有利となるかもしれないが、重大な障害にもなりうる。例えば、ニトログリセリンに対する耐性が、関係する酵素／補因子システムの消耗を介して発現する (Ignarro et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 171-191(1985); Kuhn et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., 14(Suppl. 1), S47-S54(1989))。また、ニトロプルシドの長期投与はシアン化物の代謝産物を生じさせ、毒性につながる (Smith et al., 「生物学的に反応性の中間体の抜粋集」生物学的に反応性の中間体IV、分子のお

よび細胞的効果とそれらの人間の健康に対する影響 (「A Potpourri of Biologically Reactive Intermediates」, Biological Reactive Intermediates IV. Molecular and Cellular Effects and Their Impact on Human Health)(Witmer et al.編)、実験医学と生物学における進歩、第283巻 (プレナムプレス、ニューヨーク、1991年) 365～369頁 (Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 283(Plenum Press: New York, 1991), pp. 365-369)。

NO-放出薬剤の非常に重要なクラスは酸化窒素-求核剤複合体、NO-放出 $N_2O_2^-$ (「NONOエート」；「NONOate」) 官能基を含有する化合物

(13)

特表平10-509181

である。数多くの酸化窒素-求核剤複合体が報告されている（例えば、Drago, A CS Adv. Chem. Ser., 36, 143-149(1962)）。LonghiおよびDrago, Inorg. Chem., 2, 85(1963)も参照。これらの複合体の多くは加熱または加水分解により酸化窒素を放出することが知られている（例えば、Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991)）。

最近、ある種の酸化窒素-求核剤複合体を用いて哺乳類の心臓血管障害を治療する方法が開示された（例えば、米国特許第4,954,526号）。これらの化合物はアニオン性 $N_2O_2^-$ 基またはその誘導体を含有する。Maragos et al., (前記)も参照。これらの化合物の多くは薬理学的に特に有望であることが判明した。なぜなら、ニトロプルシドやニトログリセリンのようなニトロ血管拡張剤と異なり、最初に活性化する必要がなく酸化窒素を放出するからである。純粋に自発的に酸化窒素を放出できることが現在知られている唯一の他のシリーズの薬剤は、 $R-S-NO$ 構造の化合物、 S -ニトロソチオールシリーズである（Stamler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 444-448(1992)）； S -ニトロソ- N -アセチルペニシラミンは溶液中で酸化窒素を放出し、DNA合成阻害に有効であると報告されている（Garg et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm., 171, 474-479(1990)）。しかしながら、 $R-S-NO \rightarrow NO$ 反応は速度論的に複雑であり制御が難しい（Morley et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., 21, 670-676(1993)）。同様に、モルシドミン(molsidomine)やリンシドミン(linsidomine)のような化合物はNOを放出させるために活性化が必要だけでなく、望ましくないフリーラジカルも放出する。従って、NONOエートは一次反応によりどんな所定のpHでも分解されて、予測された、定量的でかつ制御された量の酸化窒素を供給する点で現在知られている薬剤の中で有益である。例えば、Maragos et al., (前記)参照。

水溶液中で酸化窒素を放出する酸化窒素/求核剤複合体はまた、米国特許第5,039,705号、第5,155,137号、第5,185,376号、第5,208,233号、第5,212,204号、第5,250,550号、ならびに係属中の米国特許出願番号07/950,637（1992年9月23日出

(14)

特表平10-509181

願)、および07/858, 885(1992年3月27日出願)にも有用な心臓血管作用薬として開示されている(Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991)も参照)。

かなりの研究と相当な財源の支出にもかかわらず、癌の有効な治療方法の必要性がいまだに残されている。特に、転移で起こるような癌性細胞と非癌性構造との間の接着(adherence)を阻害する有効な方法が要求されている。従って、ひとつの局面において、本発明は、本方法を必要とする患者において、転移で起こるような癌性細胞と非癌性構造との間の接着(adherence)を阻害する方法を提供する。本発明のその他の目的や長所、ならびに他の発明の特徴は、ここに述べる発明の記載から明らかとなるだろう。

発明の要旨

本発明は、哺乳類(特にヒト)における癌性細胞と非癌性構造との間の接着(adherence)を阻害する方法を提供する。本方法は、それを必要とする哺乳類に、酸化窒素放出官能基 $N_2O_2^-$ を含有する酸化窒素放出薬剤を投与することを含む。酸化窒素放出薬剤は接着阻害有効量(adherence-inhibiting effective amount)の酸化窒素を当該哺乳類に放出して、癌性細胞と非癌性構造との間の接

着(adherence)を阻害する(ここで、「非癌性構造」という語は、細胞、組織、膜、臓器などをいう)。本発明は転移のリスクを減少させる方法を提供する。当該方法もまた、投与を必要とする哺乳類に酸化窒素放出薬剤を投与することを含む。

この薬剤は、酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基を含有する単量体であってもよいし、あるいは酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が結合した高分子を含有する高分子組成物であってもよい。この高分子はまた生体高分子であってもよい。この薬剤は接着阻害有効量(adherence-inhibiting effective amount)の酸化窒素を、当該哺乳類における癌性細胞と非癌性構造との間の接着(adherence)のリスクのある部位、特に転移のリスクのある部位に局所的に放出することができる。

図面の簡単な説明

図1は、リボポリサッカライド(LPS)、DETA/NO(H_2NCH_2CH

(15)

特表平10-509181

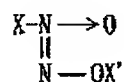
$\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ）、またはLPSとDETA/NOの非存在下または存在下での小静脈（VEN）および小動脈（ART）に対して接着した腫瘍細胞（adherent tumor cell）の%の棒グラフである。

発明の詳細な説明

本発明は、哺乳類における癌性細胞と非癌性構造との間の接着（adherence）を阻害する方法を提供し、哺乳類における転移のリスクを減少させるのに有用である。本方法は、哺乳類（特にヒト）に、酸化窒素放出官能基 N_2O_2^- を含有する酸化窒素放出薬剤を投与することを含む。この薬剤は、酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基を含有する化合物または酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基が結合した高分子を含有する高分子組成物である。この薬剤は、潜在的に転移性の癌性細胞に（例えば、免疫化学的相互作用により）付着して、それにより転移を阻害するのに十分なNOを細胞に投与することができる、あるいは接着阻害有効量（adherence-inhibiting effective amount）の酸化窒素を、当該哺乳類における非癌性構造の

転移のリスクのある部位に局所的に放出することができる。酸化窒素放出高分子組成物は多くの形態で、例えば、後記でより詳細に説明するような臓器または細胞特異的生体高分子として、またはインプラント、リボソーム、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ビーズまたはディスクとして投与することができる。「接着阻害有効」量（“adherence-inhibiting effective” amount）は投与量に関して後述する。

有用な薬理学的薬剤は、酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基を単量体または高分子（生体高分子を含む）に取り込むことにより提供され得る。本発明の方法で使用に適した酸化窒素放出薬剤は式：



（式中、Xは有機または無機部位であり、X'は有機または無機置換基、医薬上許容される金属中心、医薬上許容されるカチオンなどである。）で定義される。 N_2O_2^- 基は結合基XおよびX'のいずれか一方または両方を介して生体高分子に結合している。

(17)

特表平10-509181

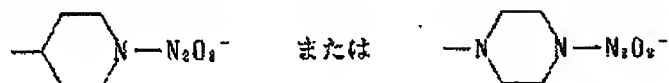
(式中、bおよびdは同一または異なって0または1であり、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は同一または異なって水素、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フクロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、yおよびzは同一または異なっ

て2～12の整数である。)：

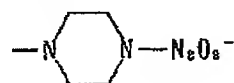
言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 155, 137号に記載されている



(式中、Bは



であり、 R_6 および R_7 は同一または異なって水素、 C_{3-8} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フクロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、fは0～12の整数であり、ただしBが置換されたピペラジン部位

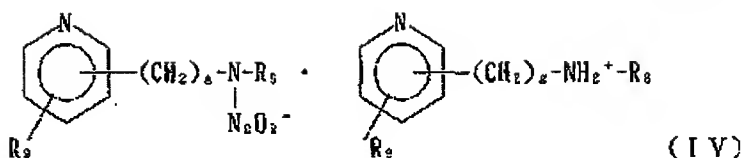


の場合、fは2～12の整数である。)：

言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 250, 550号に記載されている

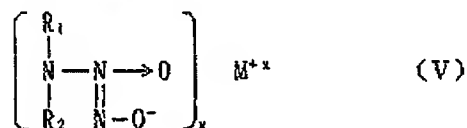
(18)

特表平10-509181



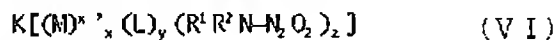
(式中、 R_5 は水素、 C_{1-8} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、 p -トルイル、 t -ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ- t -ブトキシカルボニルであり、 R_6 は水素または C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキルであり、 g は2~6である。)；

言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 039, 705号および同第5, 208, 233号および1993年2月12日に出願された米国特許出願番号08/017, 270に記載されている



(式中、 R_1 および R_2 は独立して直鎖または分枝鎖 C_{1-12} アルキル基およびベンジル基からなる群より選ばれ、あるいは R_1 および R_2 が窒素原子と共に結合して、複素環基、好ましくはピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、 M^{+x} は医薬上許容されるカチオンであり、 x はカチオンの原子価である。)；

言及によってここに組み入れられる1992年3月27日に出願された米国特許出願番号07/858, 885に記載されている



(式中、 M は医薬上許容される金属、または x が少なくとも2の場合、異なる2

種の医薬上許容される金属の混合物であり、 L は $(R^1 R^2 N - N_2 O_2)$ とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 R^1 および R^2 はそれぞれ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、 x は1~10の整数

(19)

特表平10-509181

であり、 x' は金属Mの形式的な酸化状態 (formal oxidation state) を示し、
 1～6の整数であり、 y は1～18の整数であり、 y が少なくとも2の場合、配
 位子Lは同一または異なっているてもよく、 z は1～20の整数であり、Kは化合
 物を必要な程度まで中性にする医薬上許容される対イオンである。) ；
 言及によってここに組み入れられる米国特許第4, 954, 526号に記載され
 ている



(式中、RはC₂₋₈低級アルキル、フェニル、ベンジルまたはC₃₋₈シクロアルキ
 ルであり、任意のR基は1～3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基
 は同一または異なっていて、ハロゲン、ヒドロキシ、C₁₋₈アルコキシ、-NH₂
 、-C(O)NH₂、-CH(O)、-C(O)OHおよび-NO₂からなる群より
 り選ばれ、Xは医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、または
 C₁₋₈低級アルキル、-C(O)CH₃および-C(O)NH₂からなる群より選
 ばれる医薬上許容される有機基であり、 y は1～3であり、Xの原子価と一致す
 る。) ；

言及によってここに組み入れられる1992年9月23日に出願された米国特許
 出願番号07/950, 637に記載されている



〔式中、R₁およびR₂は独立して、C₁₋₁₂直鎖アルキル、アルコキシまたはアシ
 ルオキシで置換されたC₁₋₁₂直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換さ

れたC₂₋₁₂直鎖アルキル、C₃₋₁₂分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アル
 コキシまたはアシルオキシで置換されたC₃₋₁₂分枝鎖アルキル、C₃₋₁₂直鎖オレ
 フィンおよびC₃₋₁₂分枝鎖オレフィン（これらは置換されていないか、またはヒ
 ドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されてい
 る）から選ばれるか、あるいはR₁およびR₂がそれらが結合している窒素原子と
 共に複素環基、好ましくはピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリ
 ノ基を形成し、R₃は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、ア

(20)

特表平10-509181

シルオキシまたはアルコキシで置換されているC₁₋₁₂直鎖およびC₃₋₁₂分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシルオキシまたはヒドロキシで置換されているC₂₋₁₂直鎖またはC₃₋₁₂分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されているC₁₋₁₂アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基：あるいはR₃は式—(CH₂)_n—ON=N(O)NR₁R₂（式中、nは2～8の整数であり、R₁およびR₂は上記に定義した通り）で表される基であり、好ましくは、R₁、R₂およびR₃はヘテロ原子のαにハロゲンまたはヒドロキシ置換基(a halo or a hydroxy substitute α to a hetero atom)を含まない。]

本発明に合わせて、酸化窒素放出薬剤は、本願と同日に出願されたSaavedraらの米国特許出願に記載されているような高分子組成物または生体高分子組成物であってもよい。「高分子に結合している」という語はN₂O₂⁻官能基が物理的または化学的に、高分子に結びついている(associated)、一部、高分子に取り込まれている(incorporated)または高分子内に含有されている(contained)ことを意味する。N₂O₂⁻官能基の高分子との物理的な結びつき(association)または結合(bonding)は、高分子を酸化窒素／求核剤複合体と共沈させることにより、ならびにN₂O₂⁻基の高分子との共有結合により達成することができる。N₂O₂⁻官能基の高分子との化学的結合は、例えば、酸化窒素／求核剤付加物の求核剤部分が高分子と共有結合し、N₂O₂⁻基が結合している求核剤残基が高分子自身の一部を形成するような(すなわち、高分子のバックボーン(backbone)

中にある、または高分子のバックボーン上のペンダント基に結合している)共有結合であってもよい。酸化窒素放出N₂O₂⁻官能基が高分子に結びついている、一部、高分子に取り込まれているまたは高分子内に含有されている、すなわち高分子に「結合」(“bound”)している方法は本発明において重要ではなく、全ての結びつき(association)、取り込み(incorporation)および結合(bonding)の手段が本発明で意図されている。N₂O₂⁻官能基を高分子内に取り込むことにより、目的とする生物学的部位にNOを局在化して放出させるために投与することのできる高分子結合酸化窒素／求核剤付加物組成物が提供されることが見出されている。

(21)

特表平10-509181

る。高分子結合付加物組成物の部位特異的送達は、酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基の作用の選択性を高める。もし高分子に結合した N_2O_2^- 官能基が必然的に局在化しているならば、官能基の酸化窒素放出効果はそれらと接触した組織に集中するだろう。もし高分子が可溶性ならば、例えば、フィブリンまたは組織トロンボプラスチンに対する抗体のような標的組織に対して特異的な抗体に結合することにより、あるいはそのような抗体の誘導体とすることにより、作用の選択性をさらにアレンジすることができる。同様に、重要な受容体のリガンドの認識配列を模倣したペプチドに N_2O_2^- 基を結合することにより、核酸中の標的配列との部位特異的な相互作用が可能なオリゴヌクレオチドに結合する場合と同様な、酸化窒素放出の局在化した集中した効果を与える。他の蛋白質、核酸および多糖類（ホルモンおよび運動性、化学走性および管外遊出因子または物質を含む）も同様に利用できる。

例えば、保護された N_2O_2^- 基を有するピペラジンは、腫瘍細胞化学走性に重要なIKVAV認識配列を含有するポリペプチドに共有結合させることができる。得られた分子が、抗化学走性剤(antichemotactic agent)としてのNO再生能と、腫瘍細胞および／または腫瘍細胞が接着(attach)および管外遊出する傾向がある血管系およびリンパ系の部位に対するIKVAV配列のアフィニティとの両方を保持しているならば、転移を減少させる、あるいは予防することもできる。

本発明に関して、広範な種類の如何なる高分子も使用可能である。選択される

高分子は、ただ、生物学的に許容し得るものであればよい。本発明において使用に適した高分子を例示すれば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデン ジフルオライド、ポリビニルクロライド等のポリオレフィン；ポリエチレンイミンまたはその誘導体；ポリエチレングリコール、多糖類等のポリエーテル；ポリ（ラクチド／グリコリド）等のポリエステル；ナイロン等のポリアミド；ポリウレタンが挙げられる。本発明に関して、広範な種類の如何なる生体高分子も使用可能である。使用に適した生体高分子としては、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、核酸（例、RNAおよびDNA）、糖蛋白質、グリコゲン等が挙げられる。あるい

(22)

特表平10-509181

は、脂肪酸、グルコース、アミノ酸、スクシネート、リボヌクレオチド、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオシドのような生体高分子のサブユニットが使用できる。具体例としては、抗体またはその断片；ラミニン、フィブロネクチンのような細胞外マトリックス蛋白質またはそれらの細胞接着部位ペプチド認識配列 (cell attachment-site peptide recognition sequence) (RGDS、IKVAV、YIGSRなど)；および成長因子、ペプチドホルモン、および高アフィニティ細胞表面受容体部位のある他のポリペプチド (例えば、EGF、TGF α 、TGF β および TNF) が挙げられる。このような分子は、受容体に結合したとき、標的細胞内に内在化されて、それによってNO供与体部分の細胞間送達を促進する。

好ましくは、高分子結合および生体高分子結合NONOエートでは、N₂O₂⁻官能基が結合基XまたはX'のいずれか一方または両方を介して高分子または生体高分子に結合している。

高分子結合酸化窒素放出組成物は広範な種類の形態で投与することができる。如何なる形態の送達手段も放出前の酸化窒素の完全な状態を適当に保護し、癌性細胞と非癌性細胞との間の接着 (adherence) を阻害する、より好ましくは、転移のリスクを阻害する効果的な手段となりうるような速度、量、および場所で酸化窒素の放出を制御するものでなければならない。例えば、局所投与用または局在

化して放出するための投与用の送達手段としては、インプラント、パッチ、ステント、リボソーム、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ビーズ、粉末、液体、ゲル、モノリシック樹脂、ディスクまたはその他のデバイスが挙げられるが、これらに限定されない。局所的な投与または放出の有利な点は、全身的な投与または放出に比べて、より少ない投与量を用いてより速く標的部位で効果的な薬物濃度を得ることができ、より低い毒性副作用を実現することである。局在化して放出するための全身投与用の送達手段としては、溶液剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、小袋 (sachet)、錠剤、経皮 (局所) 投与用パッチ、喉飴 (lozenge)、エアロゾル剤、リボソーム、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ビーズ、プロドラッグ、リガンド認識配列を模倣した小さなペプチド、および配列特異的オリゴヌクレオ

(23)

特表平10-509181

チド（前記で説明）が挙げられるが、これらに限定されない。

上記化合物を含めた、 N_2O_2^- 官能基を有する酸化窒素放出複合体は、多数の異なる方法により高分子支持体に結合させることができる。例えば、上記化合物は、化合物を高分子とともに共沈させることにより、当該高分子に結合させることができる。共沈は、例えば、高分子と酸化窒素／求核剤化合物とを可溶化し、溶媒を蒸発させることからなる。また N_2O_2^- 基を含有する単量体を、溶融した高分子に溶解し、温度を下げて固体化させたときに、マトリックス中に N_2O_2^- 基がある程度均一に分布するように含有させてもよい。

あるいは、酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基は、上記の式を有するタイプの酸化窒素／求核剤複合体を、その場で高分子上に形成することにより、高分子に結合し得る。 N_2O_2^- 官能基は、高分子のバックボーン (backbone) の原子に結合するか、または高分子バックボーンにぶらさがっている基に結合するか、あるいは単に高分子マトリックスに補足されるだけでもよい。 N_2O_2^- 官能基が高分子バックボーンにある場合、高分子は将来の放出のために酸化窒素に結合すべく、酸化窒素と反応し得る部位をバックボーンにもつ。 N_2O_2^- 官能基が高分子バックボーンにぶらさがっている基の場合、高分子は、酸化窒素と反応して N_2O_2^- 官能基を形成し得る適当な求核剤残基を含むか、あるいは当該求核剤残基で誘導

体とされている。このように、適当な求核性残基を含む高分子または適当に誘導体とされた高分子と酸化窒素との反応は、高分子結合酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基を提供する。

例示として、幾つかの一般的な手段が、NONOエート官能基が結合した生体高分子を含有する生体高分子組成物の合成に利用できる。一例として、構造 $\text{X}-\text{N}_2\text{O}_2^-$ のイオンを求電子剤 ($[\text{X}']$ 供与体) と反応させると、共有結合した式 $\text{X}-\text{N}(\text{O})=\text{NOX}'$ のNONOエートを生じる。この保護された複合体を次いで所望の生体高分子に求核剤残基 X 、または求電子剤残基 X' を介して結合する。あるいは、すでに生体高分子の一部である（あるいは生体高分子に結合し得る）求核剤残基を塩基性条件下でNOと反応させて N_2O_2^- 官能基を含有する酸化窒素複合体を得ることもできる。特定の例として、第二級アミノ基を有する

(24)

特表平10-509181

単純なアミノ酸を酸化窒素と反応させて本発明による化合物を生じさせることができる。同様に、NO官能基をペプチドの塩基性窒素に結合させることができる。NONOエート含有分子を本発明に従ってペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質のチオールまたは活性化カルボン酸基に結合させる代替りの手段を用いることができる。

さらに、例示として、 $N_2O_2^-$ 官能基をarg-gly-asp (RGD) のようなペプチドに結合して、分子arg-gly-asp- $[N(O)NO]^-$ を調製してもよい。好ましくは、RGDトリペプチドは追加のペプチドユニットのような結合基を介してNONOエートに結合するだろう。その他の受容体/リガンド認識配列を同様にして用いることができる。

本発明の酸化窒素放出化合物および高分子結合酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基組成物を動物に投与する適当な方法を利用し得ること、およびある特定の組成物を投与するために一を超える投与経路を用いることができるが、ある特定の投与経路が別の投与経路よりも、より迅速により効果的な反応を提供することは、当業者であれば理解できるであろう。医薬的に許容される担体もまた当業者によく知られている。担体の選択は、特定の組成物ならびに組成物を投与するために用

いられる特定の方法によりある程度決定されるだろう。従って、本発明の医薬組成物の適当な処方は多種多様である。

経口投与に適した処方は、(a) 水または生理食塩水のような希釈剤に溶解した有効量の高分子結合組成物のような液体溶液、(b) 予め決められた量の活性成分を固形物又は顆粒としてそれぞれ含むカプセル剤、小袋 (sachet)、錠剤、(c) 適当な液体に懸濁した懸濁剤、および (e) 適当な乳剤からなりうる。錠剤は、乳糖、マンニトール、コーンスターチ、ポテトスターチ、微結晶セルロース、アラビアゴム、ゼラチン、コロイド状シリコンジオキシド、クロスカルメロースナトリウム (croscarmellose sodium)、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、矯味剤、及び薬理学的に適合し得る担体の一またはそれ以上を含んでいてもよい。喉飴 (lozenge) は、矯味剤、通常、ショ糖およびアラビアゴムまたはトラガ

(25)

特表平10-509181

ント中に活性成分を含み、同様に香剤(pastilles)は、ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアラビアゴム乳剤、ゲル剤等の不活性基剤中に活性成分を含み、活性成分に加えて当分野で知られた担体を含む。

本発明の酸化窒素放出組成物は、単独でまたは他の適当な成分と組み合わせて、吸入により投与されるエアロゾル処方に調製され得る。これらのエアロゾル処方、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の加圧された許容し得る噴射剤中に置かれる。

非経口投与に適切な処方としては、抗酸化剤、緩衝液、制菌剤および該処方を投薬を受ける者の血液と等張にするための溶質を含有することのできる水性および非水性の等張性無菌注射溶液、および懸濁化剤、溶解補助剤、増粘剤、安定化剤および保存剤を含有することのできる水性および非水性の無菌の懸濁液が包含される。この処方は、アンプルおよびバイアルのような1回投与量または複数回投与量の密閉された容器で供せられ、注射には使用直前に、例えば水のような無菌の液体担体を添加するだけでよいフリーズドライ(凍結乾燥)した状態で保存され得る。即席注射溶液および懸濁液は前に述べた種類の無菌の粉末剤、顆粒剤

および錠剤から調製され得る。

本発明において動物、特にヒトに投与する量は、適当な時間枠にわたって動物に対して治療反応の効果を奏するのに十分なものとすべきである。投与量は、用いられるある特定の高分子組成物の強さ、用いられる送達手段のタイプ、投与経路、治療すべき動物の状態および体重、投与の時期、および投与時間の長さにより決定されるであろう。投与量はまた、ある特定の組成物の投与に伴うかもしれない悪い副作用の有無、性質及び程度によっても決定されるであろう。この投与量は治療、改善または予防されるべき状態に従って急性的にまたは長期的に投与される。NOの「接着阻害有効量」(“adherence-inhibiting effective amount”)は上記に定義したような癌性細胞と非癌性構造との間の接着を阻害する量である。

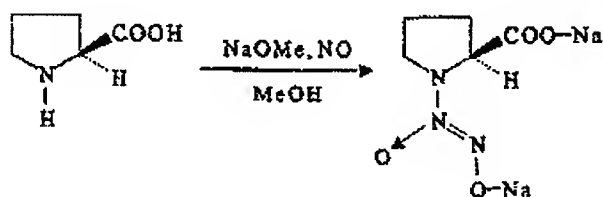
以下の実施例により本発明をさらに説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

(26)

特表平10-509181

実施例実施例 I

この実施例では、以下に模式的に示すように、1-(2S-カルボキシピロリジン-1-イル)-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼン二ナトリウム塩の調製について説明する。

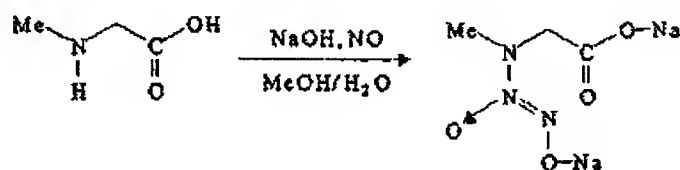


25%ナトリウムメトキシド(メタノール中)39ml(0.18mol)およびメタノール20ml中の、L-プロリン10g(0.087mol)の溶液を脱気し、40psiのNOに20時間曝露した。圧力を緩めて固形残渣を濾過にて集め、エーテルで洗浄し、減圧下で乾燥して白色固体17gを得た：UV(0.01M NaOH) $\lambda_{max}(\epsilon)$ 250 nm($\epsilon = 4.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)；NMR(D_2O) δ 1.71(m,

1H), 1.91(m, 2H), 2.27(m, 1H), 3.27-3.43(m, 2H), 4.04(m, 1H)。メタノールのピークも存在したが、該固体にはプロリンおよびN-ニトロソプロリンは両方とも含まれなかった。

実施例 II

この実施例では、以下に模式的に示すように、1-ヒドロキシ-2-オキソ-3-カルボキシメチル-3-メチル-1-トリアゼン二ナトリウム塩の調製について説明する。



メタノール100mlおよび水20ml中の、水酸化ナトリウム8g(0.2mol)の溶液にサルコシン8.9g(0.1mol)を加えた。該溶液に40psiのNOを負荷し、25℃で48時間攪拌した。圧力を緩め、該溶液を減圧

(27)

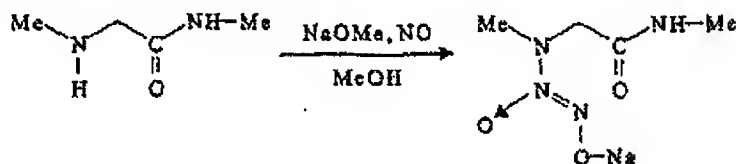
特表平10-509181

濃縮して、UV λ_{max} 250 nmの白色固体を得た。蒸留物は強いアミン臭を有し、メチルアミンの塩化ベンゾイル誘導体であると決定された。

該固形残渣を高真空下で乾燥後、D₂O中のNMRにより解析した。NMRにより5つの生成物が検出された：メチルアミン、 δ 2.28, 36%；1-ジメチルアミノ-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩、 δ 2.79, 15%；N-ニトロソジメチルアミン、 δ 3.11 および3.91, 8%；N-ニトロソサルコシンナトリウム塩、 δ 3.15(s, E メチル), 3.84(s, Z メチル), 4.21(s, Z メチレン), 4.80(s, E メチレン), 10%。標記化合物は該混合物の32%として存在した： δ 3.11(s, 3H)および3.60(s, 2H)。

実施例III

この実施例では、以下に模式的に示すように、1-ヒドロキシ-2-オキソ-3-カルボキシメチル-3-メチル-1-トリアゼンN-メチルアミドナトリウム塩の調製について説明する。



40%メチルアミン水溶液150 ml (1.9 mol)を0℃まで冷却した。該溶液に10M水酸化ナトリウム40 mlを加え、続いて α -クロロアセチルクロリド(27 g, 0.24 mol)を0℃で2時間かけて注意深く加えた。

室温にて一晩攪拌し続けた。得られた溶液を塩化ナトリウムで飽和させ、ジクロロメタンで抽出して硫酸ナトリウムで乾燥し、硫酸マグネシウム層を通して濾過した。溶媒のほとんどをロータリーエバポレーターで除去し、残渣を1気圧にて、次いで適当な減圧下で蒸留した。該生成物を90～2℃、125 mmHgで蒸留してサルコシンN-メチルアミド15 g (61%)を得た；IR (film) 3318, 2952, 2889, 1659, 1553, 1462, 1413, 1166 cm^{-1} ；NMR (CDCl₃) δ 2.42(s, 3H), 2.86(s, 1.5H), 2.83(s, 1.5H), 3.23(s, 2H)。

25%ナトリウムメトキシド(メタノール中) 3.5 ml (0.016 mol)

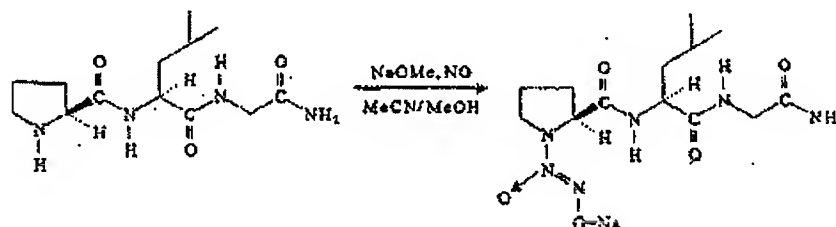
(28)

特表平10-509181

中のサルコシンN-メチルアミド1, 7 g (0.0167 mol) の溶液を圧力ビン中に置き、窒素をどっと流した後、40 psi の酸化窒素を負荷した。該溶液を48時間25℃に保って濃厚なペーストを得た。圧力を緩め、残渣をエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥して、UV $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 250 nm (2.4 mM⁻¹ cm⁻¹) の固体1.4 gを得た。

実施例IV

この実施例では、以下に模式的に示すように、L-プロリル-L-ロイシルグリシンアミドのビス(酸化窒素)付加物の調製について説明する。



アセトニトリル4 ml中のL-プロリル-L-ロイシルグリシンアミド(Sigma) 120 mg (0.423 mmol)のスラリーに、メタノール中の25%ナトリウムメトキシド100 μ lを加えた。得られたゲルを均一な溶液が得られるまで数滴のメタノールで処理した。該溶液を微小Parrビンに移し、5分間窒素で発泡した後、40 psiのNOに72時間曝露した。該反応混合物を減圧下で乾燥して、pH 7.4の緩衝液中での $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 250 nm (6.2 mM⁻¹ cm⁻¹) の固体187 mgを得た。この固体は37℃で7分の半減期で0.86 molのNO(このpHで分解されるトリペプチド1 molあたり)を放出した。

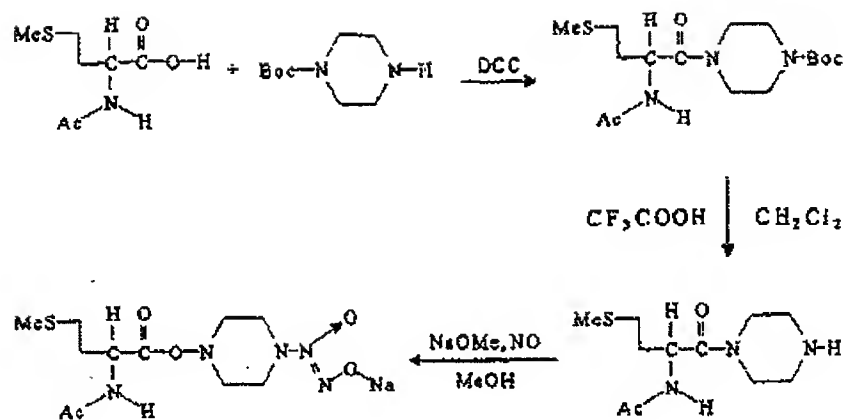
鎖長を増したオリゴペプチドおよび蛋白質も同様にNOによって誘導することができる。

実施例V

この実施例では、以下に模式的に示すように、NOと容易に反応する求核中心を含まない蛋白質への求核中心の結合について説明する。

(29)

特表平10-509181



CH₂Cl₂:アセトニトリル(120ml)中のN-アセチル-L-メチオニン4.78g(0.025mol)の溶液を0℃に冷却した。この溶液にジシクロロヘキシルカルボジイミド(DCC)5.36g(0.025mol)を加えた後、ジクロロメタン6ml中のN-tertブトキシカルボニルピペラジン3.90g(0.021mol)をすばやく加えた。アセトニトリル:テトラヒドロフラン(4:1)で展開したシリカゲルTLCプレート上で反応を追跡し、ヨウ素あるいはニンヒドリンスプレーのいずれかを用いて可視化した。反応は2時間以内に完了した。該反応混合物に数滴の水酢酸を加え、溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。残渣をエーテルにとり濾過した。透明な濾液を希酸、次いで希塩基で洗浄した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、さらに溶媒留去して、1-(tertブトキシカルボニル)-4-(N-アセチル-L-メチオニル)ピペラジンの、さらなる精製を要しない無色の油8.2gを得た: IR (film) 3304, 3058, 2973, 2931, 2868, 1701, 1645, 1539, 1420, 1237, 1173 cm⁻¹; NMR (CDCl₃) δ 1.47(s, 9H), 1.80(m, 2H), 2.02(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.46(m, 2H), 3.53(m, 8H), 5.10(m, 1H), 6.35(b, 0.5H), 6.43(b, 0.5H)。

ジクロロメタン60ml中の1-(tertブトキシカルボニル)-4-(N-アセチル-L-メチオニル)ピペラジン8.6g(0.024mol)の溶液に、

トリフルオロ酢酸10mlを加え、該混合物を室温にて一晚攪拌した。該溶液を

(30)

特表平10-509181

水で抽出し、得られた水性溶液を水酸化ナトリウムを用いてアルカリ性にした。該生成物をジクロロメタンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥後、濾過した。溶媒を留去して1-(N-アセチル-L-メチオニル)ピペラジン2.1gを油として得た: IR (film) 3304, 3051, 2917, 2861, 1645, 1546, 1448, 1377 cm^{-1} ; NMR (CDCl_3) δ 1.95(m, 2H), 2.02(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.54(m, 2H), 2.98(m, 4H), 3.74(m, 4H), 5.10(m, 1H), 6.40(b, 0.5H), 6.48(b, 0.5H)。

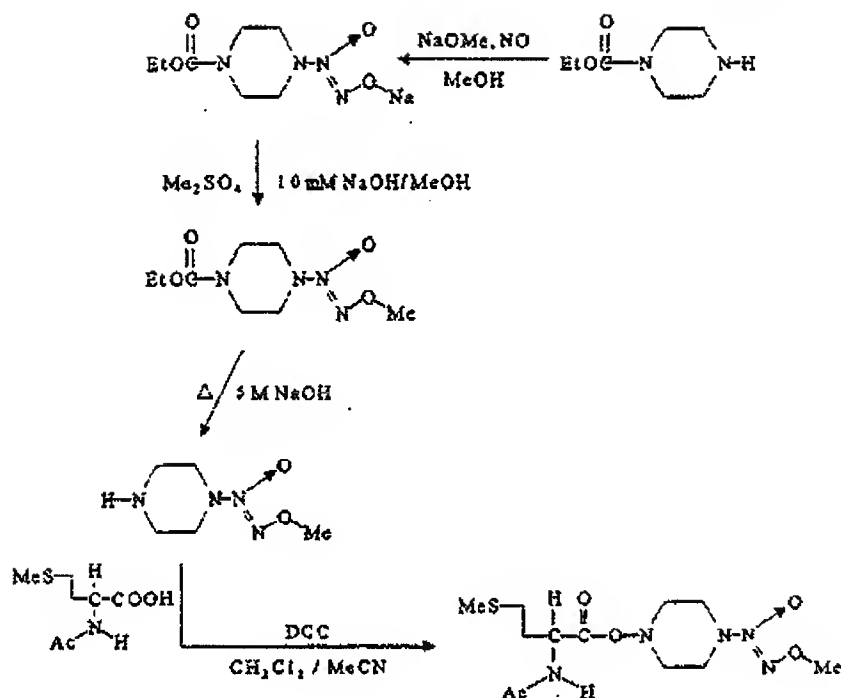
メタノール1ml中の1-(N-アセチル-L-メチオニル)ピペラジン510mg (1.97mmol)の溶液に、メタノール中の25%ナトリウムメトキシド428 μ l (1.97mmol)を加えた。この系を脱気して40psiのNOを負荷した。該溶液をNOに120時間曝露した後、圧力を緩めて、固体生成物を濾過にて集め、エーテルで洗浄後、乾燥して1-[4-(N-アセチル-L-メチオニル)ピペラジン-1-イル]-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩27mgを、UV λ_{max} (ϵ) 252nm (12.0 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)の白色固体として得た。該生成物はpH7および25℃にて6.9分の半減期で分解して試薬1molあたり1.72molのNOを生成した。

実施例VI

この実施例では、以下に模式的に示すように、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質のC末端に、前もって形成しておいた求核窒素原子を含むNONOエートの結合について説明する。

(31)

特表平1-0-509181



メタノール 60 ml 中の 1-ピペラジンカルボン酸エチル 20 g (0.126 mol) の溶液を Parr ビン中に置き、該溶液をメタノール中の 25% ナトリウムメトキシド 27.4 ml (0.126 mol) で処理した。この系を脱気し、40 psi の酸化窒素を負荷して 25℃ に 48 時間保った。白色結晶状生成物を濾取し、冷メタノール、さらに多量のエーテルで洗浄した。該生成物を減圧乾燥して収量 14.5 g (48%) の 1-(4-カルボトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩を得た；融点 184-5℃；UV (0.01 M NaOH) λ_{max} (ϵ) 252 nm (10.4 $\text{m}^2 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)；NMR (D_2O) δ 1.25 (t, 3H), 3.11 (m, 2H), 3.68 (m, 2H), 4.15 (q, 2H)。元素分析 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ 計算値：C, 35.00%；H, 5.42%；N, 23.33%；Na, 9.58%。実測値：C, 34.87%；H, 5.53%；N, 23.26%；Na, 9.69%。この化合物の pH 7 および 25℃ での半減期は 5 分であった。この測定は紫外線スペクトルにおける 252 nm の発色団の消失

に基づいた。

(32)

特表平10-509181

0.01 M水酸化ナトリウム水溶液10 ml中の1-(4-カルベトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩1.3 g (5.4 mmol)の溶液を氷浴中で冷却した。メタノール10 ml中の硫酸ジメチル2 mlの溶液を滴下した。得られた溶液を0℃にて1時間攪拌した後、室温まで徐々に温まるようにした。24時間後、該溶液をロータリーエバポレーターで濃縮した。残渣をジクロロメタンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥して、硫酸マグネシウム層を通して濾過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲル上のクロマトグラフィーにかけた。ジクロロメタン：酢酸エチル(2:1)で溶出することにより、1-(4-カルベトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン683 mg (55%)が油として得られ、静置することにより結晶化した：融点 46℃; UV $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 240nm(8.4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); IR(film) 2988, 2945, 2875, 1707, 1504, 1068 cm^{-1} ; NMR δ 3.38(m, 4H), 3.67(m, 4H), 4.03(s, 3H), 4.16(q, 2H); MS m/z(相対強度, %), 232(M⁺, 3), 217(16), 187(10), 157(100), 142(5), 98(4), 85(27), 70(26), 56(94), 54(19); C₈H₁₀N₄O₄の計算される正確な質量(M⁺) 232.1171, 実測値 232.1172。元素分析C₈H₁₀N₄O₄ 計算値: C, 41.38%; H, 6.90%; N, 24.14%。実測値: C, 41.23%; H, 6.82%; N, 24.05%。

1-(4-カルベトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン1.8 g (0.0078 mol)と5 M水酸化ナトリウム水溶液20 mlの混合物を還流加熱した。定性的薄層クロマトグラフィーで調べると、45分後には出発材料は該混合物中に残っていなかった。該溶液を室温にもどし、残渣が粘稠になるまで溶媒留去し、該残渣を酢酸エチルで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過した後、溶媒留去した。生成物をシリカゲル上のクロマトグラフィーにかけ、ジクロロメタン：アセトン(1:1)で溶出して1-(ピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン820 mg (66%)を淡黄色油として得た：UV $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 234 nm (7.0 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); NMR δ 3.03(m,

4H), 3.38(m, 4H), 4.06(s, 3H); IR (film) 3318, 2945, 2854, 1447, 1364, 1286, 1230, 1046, 1004 cm^{-1} ; MS m/z(相対強度, %), 160(M⁺, 2), 145(7), 143

(33)

特表平10-509181

(10), 115(9), 85(56), 58(7), 56(100); $C_{12}H_{12}N_4O_2$ の計算される正確な質量 (M) 160.0960, 実測値 160.0966。

ジクロロメタン：アセトニトリル (1 : 1) 10 ml 中の N-アセチル-L-メチオニン 164 mg (0.856 mmol) の溶液に、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 206 mg (1 mmol) を加え、次いでジクロロメタン 3 ml 中の 1-(ピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン 137 mg (0.856 mmol) をすばやく導入した。該反応混合物を 25℃ にて 4 時間撹拌した。氷酢酸を数滴加えて過剰の DCC を分解した。該混合物を濾過し、溶媒留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、次いでそれを希塩酸で、その後、希水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、硫酸マグネシウム層を通して濾過し、減圧下で溶媒留去した。1-(4-[N-アセチル]-L-メチオニルピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼンの精製は、アセトニトリル：テトラヒドロフラン (4 : 1) を溶出液として用いてシリカゲル上で行った；UV λ_{max} (ϵ) 230 nm (8.7 $ml \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)；NMR δ 2.02(s, 3H), 2.07(m, 2H), 2.11(s, 3H), 3.46(m, 4H), 3.83(m, 4H), 4.03(s, 3H), 5.15(m, 1H), 6.28(b, 0.5H), 6.35(b, 0.5H), IR 3297, 2931, 2847, 1645, 1546, 1497, 1441, 1223 cm^{-1} ；MS m/z (相対強度, %) 333(M⁺, 4), 318(2), 304(3), 303(16), 288(12), 260(11), 259(100), 258(9), 214(78), 184(37), 183(10), 174(5), 146(26), 142(56), 141(5), 104(63), 61(60); $C_{12}H_{12}N_4O_2S$ の計算される正確な質量 (M) 333.1470, 実測値 333.1471。

実施例VII

この実施例では、単離された小動脈および小静脈への腫瘍細胞の接着 (adhesion) に対する酸化窒素放出化合物の効果の説明するものである。

シリアンハムスターのメラニン性黒色腫細胞、RMP11846 は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (Rockville, MD) から取得し、37℃、5% CO_2 の加湿雰囲気中、20% ウシ胎仔血清 (GIBCO, Grand Island, NY) で補充した McCoy の 5A 培地 (GIBCO, Grand Island, NY) 中で成育させた。いったん癒着すると、細

(34)

特表平10-509181

胞を0.25%トリブシン (GIBCO) で簡単にトリブシン処理して回収し、完全培地で中和し、 $100\times g$ で5分間遠心した後、 145.0 mM NaCl 、 4.7 mM KCl 、 2.0 mM CaCl_2 、 1.17 mM MgSO_4 、 $1.2\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 5.0 mM グルコース、 2.0 mM ビルビン酸、 0.02 mM EDTAおよび 3.0 mM 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸 (MOPs) 緩衝液並びに1%ウシ胎仔血清 (pH 7.4に緩衝) からなる1%アルブミン生理食塩溶液 (APSS) 中に 10^6 細胞/mlの濃度となるように再懸濁し、P8濾紙 (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) を通して濾過した。腫瘍細胞の生存性はトリパンブルー染色で検定し、90%を超える生存性を有する細胞懸濁液のみを実験に使用した。

体重50g~150gの雄性Sprague-Dawleyラットに、100gあたりPSS1ml、または100gあたり 1 mg/ml のLPS (Sigma, St. Louis, MO) を含有するPSS1mlを腹腔内注射した。4時間後、ラットをイナクチン (100 mg/kg 腹腔内投与) で麻酔し、正中腹部切開を行い、上腸間膜動脈を単離してカニユーレを挿入し、温かいブクゼラチンインク溶液1mlを上腸間膜動脈カテーテルを介して腸間膜脈管系に注入して微細血管を可視化した。ブクゼラチンインク溶液は、ブク皮膚ゼラチン (Sigma, St. Louis, MO) 0.36 g と非透析の曇汁 0.2 ml を温APSS10ml中に溶解し、P8濾紙を通して濾過することにより調製した。この濃度ではゼラチン溶液は室温で液体であり、 20°C より低温で固化する。

腸の一部および付着した腸間膜を切除して、氷冷したpH 7.4のPSS (血清を加えていない以外はAPSSと同じ) を入れた解剖用チャンバーに置いた。直径 (OD) $70\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ および長さ $1.5\sim 2.0\text{ mm}$ の、分枝していない小動脈または小静脈を切り離し、隔離された管チャンバー (Halpern型) に移し、両端に直径約 $50\text{ }\mu\text{m}$ のガラスのマикроビベットでカニユーレを挿入して11-0針縫ってしっかりと締め、部屋の空気で平衡化した 37°C のPSS中に浸した。浴槽の溶液は 2 ml/分 の速度で絶えず更新した。流入カテーテ

(35)

特表平10-509181

ルに接続した重力送り式の貯水槽を介して、37℃のAPSSを管の腔に灌流させた。カニユーレ挿入後、管チャンバーを倒立顕微鏡に置いた。顕微鏡に据え付けたテレビカメラを用いてテレビモニターに画像を投影し、ビデオカセットレコーダーを用いて画像を記録した。ビデオ日時ジェネレーターが時刻、ストップウォッチ機能および日付をモニター上に投影した。ビデオカリバスを用いて管の直径を測定した。

30分の安定化期間後、管に腫瘍細胞懸濁液を灌流させた。次いで、灌流物の流入を中断し、腫瘍細胞が内皮に定着できるようにした。該微小管上に着床した細胞数を観察・記録した。20分後、流入および流出マイクロピペット間に115 cm H₂Oの圧力勾配をかけて灌流物の流れを再開した。5分後、管壁に接着(adherent)して留まっている腫瘍細胞数を計測・記録した。5分間流れを再開した後の管壁に接着(adherent)した残留腫瘍細胞数を、流れを中断した時に管壁に着床した総細胞数で割ることにより、接着(adherent)した細胞のパーセンテージを算出した。一元ANOVAおよびStudent-Newman-Keuls試験を用いてグループ間の差を解析したところ、 $P < 0.05$ で有意であると見なされた。

前毛細管小動脈および後毛細管小静脈への腫瘍細胞の接着(adhesion)に及ぼすLPSの効果を測定するために、ラットにPPS(1 mg/ml)中に溶解したLPS(Sigma)を1 mg/100 g体重の投与量で腹腔内注射した。一方、対照ラットには、PPSを1 ml/100 g体重で腹腔内注射した。4時間後、該動物を犠牲にして、上記のように腫瘍細胞接着分析(tumor cell adhesion

analysis)のために腸間膜から小動脈または小静脈を単離した。腫瘍細胞は、未処理の小動脈よりも未処理の小静脈に非常に多く接着(adhesive)し、その差は約5倍であった。後毛細管小静脈を4時間LPS処理すると、未処理の小静脈に比べて腫瘍細胞の接着(adhesion)が著しく増加した。しかしながら、前毛細管小動脈をLPS処理してもこれらの脈管への腫瘍細胞の接着(adhesion)に影響はなかった。

未処理またはLPS処理した後毛細管小静脈への黒色腫細胞の接着(adhesion)

(36)

特表平10-509181

に及ぼすDETA/NOの形態での酸化窒素の効果を図1に示す。これはLPS、DETA/NO、またはLPSとDETA/NOの非存在下または存在下でのVENおよびARTに対する接着腫瘍細胞(adherent tumor cell)の%の棒グラフである。再灌流30分前に単離した後毛細管小静脈を1mM DETA/NOで処理すると、後毛細管小静脈への腫瘍細胞接着(tumor cell adhesion)の増大に及ぼすLPSの増加効果は完全に阻止された。さらに、DETA/NOは未処理の小静脈への腫瘍細胞の接着(adhesion)も低減させた。この差は $P < 0.05$ で有意であった。

これらの結果から、 $N_2O_2^-$ 基を含有するNO供与体の形態で外部から投与されたNOが、LPSで活性化された内皮への腫瘍細胞の接着(adhesion)を阻害し得ること、並びに外因性NOがさらに生来の静脈内皮細胞への腫瘍細胞の接着(adhesion)のベースラインをも減少させ得ることがわかった。

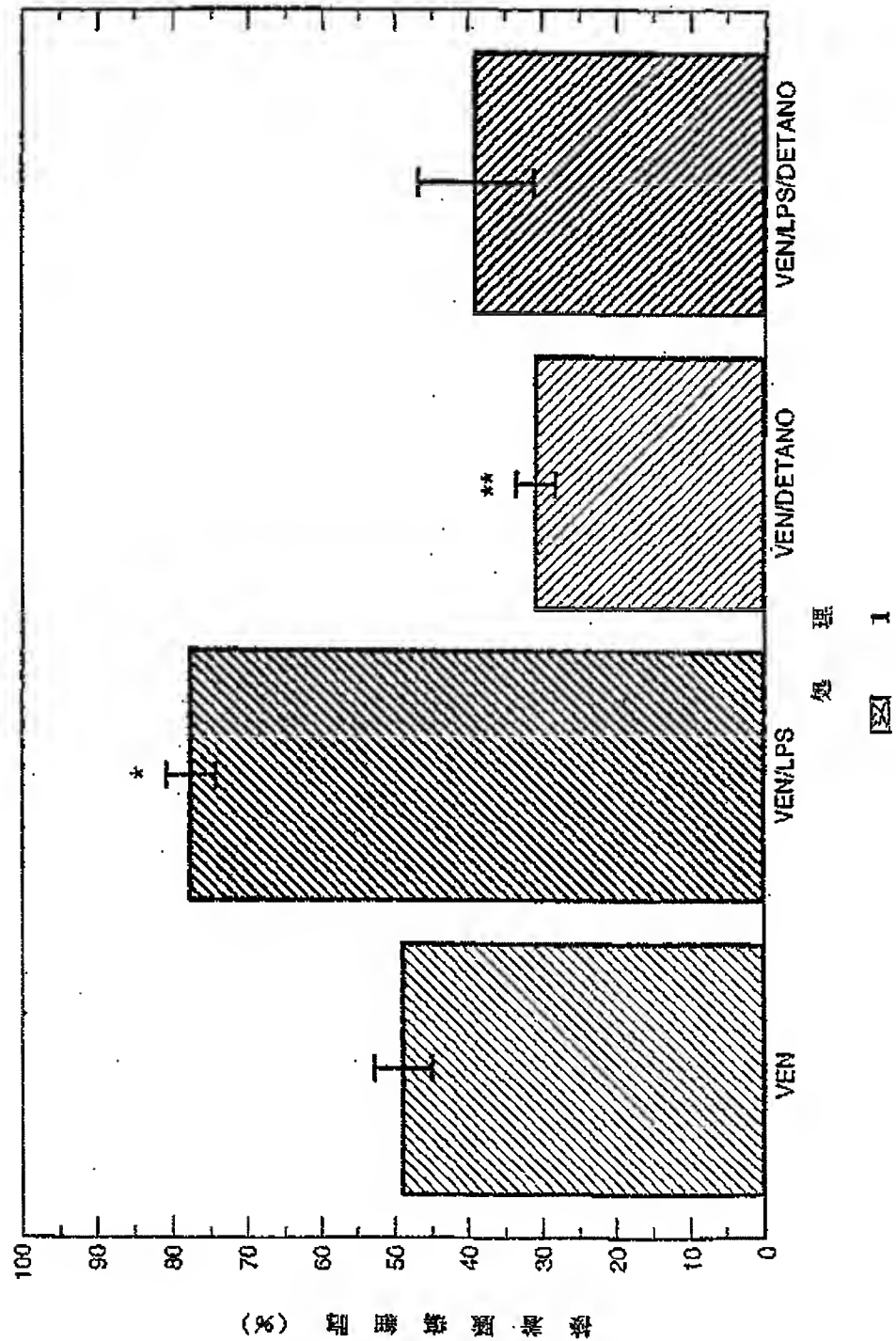
ここに挙げた刊行物、特許、および特許出願は、各個々の文書が言及によって組み込まれるために個々にそして具体的に述べられ、ここに完全に明らかにされたと同程度に、ここに言及することで組み入れられるものである。

本発明を、好ましい実施態様を強調して説明してきたが、当業者には好ましい実施態様が変更され得ることが自明であろう。本発明はここで特別に記載された以外の方法でも実施され得ることが意図される。従って、本発明は添付の請求の範囲の精神と範囲に包含されるすべての変形を含むものである。

(37)

特許平10-509181

【図1】



(38)

特表平10-509181

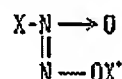
【手続補正書】

【提出日】1997年10月20日

【補正内容】

請求の範囲

1. 酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基を含有する酸化窒素放出化合物を有効成分として含有する、哺乳類における癌性細胞と非癌性細胞との間の接着(adherence)を阻害する薬剤であって、当該化合物は当該哺乳類に接着(adherence)阻害有効量の酸化窒素を放出することができるものである薬剤。
2. 当該化合物が、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチドおよび核酸からなる群より選ばれる高分子である請求の範囲第1項記載の薬剤。
3. 当該高分子が、組織特異的、細胞特異的または腫瘍特異的抗体またはその断片、腫瘍細胞接着(tumor cell attachment)に適した受容体-リガンド相互作用の認識配列を含有する蛋白質、抗化学走性剤およびホルモンからなる群より選ばれる請求の範囲第2項記載の薬剤。
4. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 基が、式



(式中、Xは有機または無機部位であり、X'はX、医薬上許容される金属中心または医薬上許容されるカチオンからなる群より選ばれる。)に含まれる基であり、当該 $N_2O_2^-$ 基はXまたはX'の少なくとも1つを介して当該生体高分子に結合している請求の範囲第1項記載の薬剤。

5. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



〔式中、Jは有機または無機部位であり、 M^{x+} は医薬上許容されるカチオン(式中、xはカチオンの原子価である)であり、aは少なくとも1であり、bおよびcは中性化合物を与える最も小さい整数である。〕に含まれる基である請求の範囲第4項記載の薬剤。

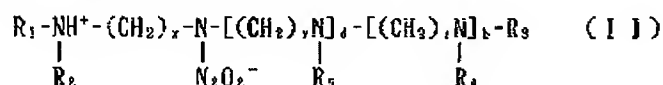
(39)

特表平10-509181

6. Jが炭素原子以外の原子を介して、複合体の残りの部分の窒素に結合している部位である請求の範囲第5項記載の薬剤。

7. 酸化窒素放出基がアラノシンまたはドバチンの塩以外の化合物である請求の範囲第5項記載の薬剤。

8. 当該酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基が式：

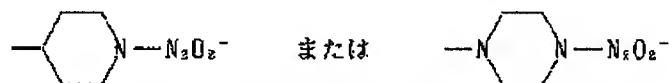


(式中、bおよびdは同一または異なって0または1であり、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 は同一または異なって水素、 C_{1-6} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、yおよびzは同一または異なって2~12の整数である。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の薬剤。

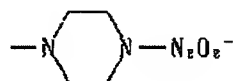
9. 当該酸化窒素放出 N_2O_2^- 官能基が式：



(式中、Bは



であり、 R_6 および R_7 は同一または異なって水素、 C_{1-6} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、fは0~12の整数であり、ただしBが置換されたピペラジン部位

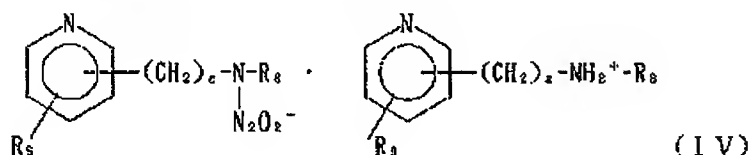


(40)

特表平10-509181

の場合、 f は 2 ～ 12 の整数である。) に含まれる基である請求の範囲第 4 項記載の薬剤。

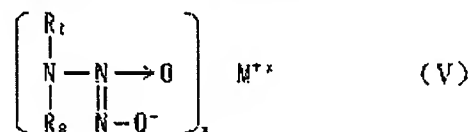
10. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、 R_8 は水素、 C_{1-8} シクロアルキル、 C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フクロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、 p -トルイル、 t -ブトキシカルボニルまたは 2, 2, 2-トリクロロ- t -ブトキシカルボニルであり、 R_9 は水素または C_{1-12} 直鎖または分枝鎖アルキルであ

り、 g は 2 ～ 6 の整数である。) に含まれる基である請求の範囲第 4 項記載の薬剤。

11. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：

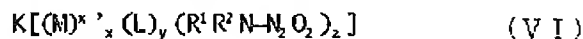


(式中、 R_1 および R_2 は独立して直鎖または分枝鎖 C_{1-12} アルキル基およびベンジル基からなる群より選ばれる。) に含まれる基である請求の範囲第 4 項記載の薬剤。

12. R_1 および R_2 が介在する窒素原子と共に結合して複素環基を形成するように R_1 および R_2 が選ばれ、 M^{+x} は医薬上許容されるカチオンであり、 x はカチオンの原子価である請求の範囲第 11 項記載の薬剤。

13. 複素環基がピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノおよびモルホリノからなる群より選ばれる請求の範囲第 12 項記載の薬剤。

14. 当該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：

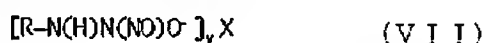


(41)

特表平10-509181

(式中、Mは医薬上許容される金属、またはxが少なくとも2の場合、異なる2種の医薬上許容される金属の混合物であり、Lは $(R^1 R^2 N-N_2 O_2)$ とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 R^1 および R^2 はそれぞれ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、xは1~10の整数であり、 x' は金属Mの形式的な酸化状態を示し、1~6の整数であり、yは1~18の整数であり、ただし、yが少なくとも2の場合、配位子Lは同一または異なっていてよく、zは1~20の整数であり、Kは化合物を必要な程度まで中性にする医薬上許容される対イオンである。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の薬剤。

15. 当該酸化窒素放出 $N_2 O_2^-$ 官能基が式：



(式中、Rは C_{2-8} 低級アルキル、フェニル、ベンジルまたは C_{3-8} シクロアルキルであり、任意のR基は1~3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基は同一または異なっていて、ハロゲン、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-CH(O)$ 、 $-C(O)OH$ および $-NO_2$ からなる群より選ばれ、Xは医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、または C_{1-8} 低級アルキル、 $-C(O)CH_3$ および $-C(O)NH_2$ からなる群より選ばれる医薬上許容される有機基であり、yは1~3であり、Xの原子価と一致する。)に含まれる基である請求の範囲第4項記載の薬剤。

16. 当該酸化窒素放出 $N_2 O_2^-$ 官能基が式：



(式中、 R_1 および R_2 は独立して、 C_{1-12} 直鎖アルキル、アルコキシまたはアシルオキシで置換された C_{1-12} 直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換された C_{2-12} 直鎖アルキル、 C_{3-12} 分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換された C_{1-12} 分枝鎖アルキル、 C_{3-12} 直鎖オレフィンおよび C_{3-12} 分枝鎖オレフィン(これらは置換されていないか、またはヒドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されている

(42)

特表平10-509181

）から選ばれるか、あるいは R_1 および R_2 がそれらが結合している窒素原子と共に複素環基を形成し、 R_3 は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、アシルオキシまたはアルコキシで置換されている C_{1-12} 直鎖および C_{3-12} 分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシル

オキシまたはヒドロキシで置換されている C_{2-12} 直鎖または C_{3-12} 分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されている C_{1-12} アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基、あるいは R_3 は式 $-(CH_2)_n-ON=N(O)NR_1R_2$ （式中、 n は2～8の整数であり、 R_1 および R_2 は上記に定義した通り）で表される基である。】に含まれる基である請求の範囲第4項記載の薬剤。

17. R_1 、 R_2 および R_3 はヘテロ原子の α にハロゲンまたはヒドロキシ置換基を含まない請求の範囲第16項記載の薬剤。

18. 複素環基がピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノおよびモルホリノからなる群より選ばれる請求の範囲第16項記載の薬剤。

19. 当該哺乳類の当該癌性細胞が潜在的に転移性である請求の範囲第1項記載の薬剤。

(43)

特表平10-509181

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Information Application No
 PCT/US 95/15361

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61K31/13 A61K31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
P,X	CA,A,2 106 105 (L.K. KEEFER ET AL.) 15 March 1996 see page 17, line 30 - line 37; claims ---	1.2.4. 6-16.18. 19
A	WO,A,93 20806 (USA DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 28 October 1993 ---	
A	WO,A,93 07114 (USA DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 15 April 1993 ---	
A	US,A,5 212 204 (KEEFER ET AL.) 18 May 1993 cited in the application ---	
A	US,A,5 259 550 (KEEFER ET AL) 5 October 1993 cited in the application ---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another class or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 1996

Date of mailing of the international search report

26.04.96

 Name and mailing address of the ISA,
 European Patent Office, P.O. 5818 Patenshaw 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-10) 540-2640, Te. 31 451 691 01,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaever, T

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1997)

(44)

特表平10-509181

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 95/15381

C.(Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
A	US,A,5 185 376 (DIODATI ET AL.) 9 February 1993 cited in the application ---	
A	US,A,5 208 233 (KEEFER ET AL.) 4 May 1993 cited in the application ---	
A	US,A,5 155 137 (KEEFER ET AL.) 13 October 1992 cited in the application -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of sheet 1) (July 1992)

(45)

特表平10-509181

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 95/15381
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark: Although all claims are directed to a method of treatment of (diagnostic method practised on) the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos. because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest:	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (I)) (July 1992)

(46)

特表平10-509181

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1. Citation on patent family members

International Application No.

PCT/US 95/15381

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CA-A-2106105	15-03-95	NONE	
WO-A-9320806	28-10-93	AU-B- 3969793	18-11-93
WO-A-9307114	15-04-93	AU-B- 2669092	03-05-93
		CA-A- 2119572	15-04-93
		EP-A- 0605622	13-07-94
		JP-T- 7502265	09-03-95
		US-A- 5366997	22-11-94
US-A-5212204	18-05-93	AT-T- 133861	15-02-96
		AU-B- 637845	10-06-93
		AU-B- 6621190	16-05-91
		CA-A, C 2070388	19-04-91
		DE-D- 69025336	21-03-95
		EP-A- 0501975	09-09-92
		JP-T- 5504760	22-07-93
		WO-A- 9105551	02-05-91
US-A-5250550	05-10-93	US-A- 5155137	13-10-92
		WO-A- 9420415	15-09-94
		AU-B- 649739	02-06-94
		AU-B- 8712391	15-04-92
		CA-A- 2091994	21-03-92
		EP-A- 0549704	07-07-93
		JP-T- 6501686	24-02-94
		WO-A- 9205149	02-04-92
US-A-5185376	09-02-93	AU-B- 667197	14-03-96
		AU-B- 2600992	27-04-93
		CA-A- 2119762	01-04-93
		EP-A- 0658107	23-06-95
		JP-T- 7503231	06-04-95
		WO-A- 9305773	01-04-93
US-A-5208233	04-05-93	US-A- 5039705	13-08-91
		AT-T- 130191	15-12-95
		AU-B- 638499	01-07-93
		AU-B- 6522690	18-04-91
		CA-A- 2066409	16-03-91

Form PCT/ISA/210 (patent family cases) (July 1993)

(47)

特表平10-509181

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Information Application No.

PCT/US 95/15381

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5208233		DE-D- 69023660	21-12-95
		EP-A- 0491864	01-07-92
		JP-B- 7098747	25-10-95
		JP-T- 5501402	18-03-93
		WO-A- 9104022	04-04-91
US-A-5155137	13-10-92	AU-B- 649739	02-06-94
		AU-B- 8712391	15-04-92
		CA-A- 2091994	21-03-92
		EP-A- 0549704	07-07-93
		JP-T- 6501686	24-02-94
		WO-A- 9205149	02-04-92
		US-A- 5250550	05-10-93

Form PCT/ISA/210 (specify family cases) (July 1992)

(48)

特表平10-509181

フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	FI	
A61K 31/70		A61K 31/70	
33/00		33/00	
38/00	ADU	C07D 295/22	Z
C07D 295/22		A61K 37/02	ADU

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, U G), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, C A, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, M G, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 コング、リブ
アメリカ合衆国、ルイジアナ州 71104、
シュリーヴポート、ワイルダー ブレイ
ス、314

(72)発明者 キーファー、ラリー ケイ、
アメリカ合衆国、メリーランド州 20817、
ベセスダ、リヴァー ロード、7016